中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）47(4)：346～363（1998）

彩虹鳥蕉組織培養之研究

Ⅰ.培植體離體培養污染細菌之檢定及防治[1]

蕭翌柱[2]　許秀惠[2]　王才義[3]　蔡新聲[2]

摘要：本試驗以彩虹鳥蕉 *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'爲材料，進行植株各部位培植體之離體培養，嘗試篩檢污染菌類，並尋求降低高污染率的方法。結果顯示，離體培養 21 天後各部位培植體皆有高污染率，其中以根莖新芽污染率 100％ 最高，葉片上半部(57.7％)較低，葉片下半部(83.3％)、葉柄(80％)、子房(90％)和花梗(96.7％)之污染率也都在八成以上；除子房外，其它培植體受眞菌類污染比例偏低，污染源以細菌性爲主，且全部爲革蘭氏陰性。各細菌單一菌落經 Biolog GN Microplate 鑑定系統分析污染菌源分別爲 *Agrobacterium radiobacter, Pseudomonas diminuta, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Sphingomonas pancimobilis* 及 *Xanthomonas campestris*，比對相似度皆達七成以上。取自溫室無土介質栽培區之各種培植體，離體培養後之平均污染數皆顯著低於取自田間者。子房培植體浸漬於含 MS 基本鹽類及添加 100 mg/l 鏈黴素(streptomycin sulfate, Sigma)、50 mg/l 見大黴素(gentamycin sulfate, Sigma)之液體培養基中振盪培養 24 小時與 48 小時，再移種於固體培養基培養 21 天後之污染率爲 40％ 與 46％，略低於浸漬於添加 50 mg/l 鏈黴素、50 mg/l 見大黴素液體培養基 24 小時與 48 小時之處理者(72％ 與 68％)，且明顯低於對照組 86％ 之高污染率；培養 45 天後，不論有無浸漬抗生素處理，其誘生癒合組織之差異不明顯。

關鍵詞：彩虹鳥蕉、離體培養、培植體、細菌檢定。

前　　言

赫蕉屬*(Heliconia)*植物目前被世界各國收集培育供觀苞或觀葉用的品種超過 200 種以上，其原生地絕大部份源自南、北美洲附近之熱帶地區，僅有少數幾個品種或變種，原生於太平洋的幾個熱帶島嶼；其分佈範圍約從墨西哥(Mexico)北迴歸線附近及加勒比海(Caribbean)熱帶島嶼開始，至位於南美洲之南迴歸線熱帶地區爲止[(16)]。

赫蕉屬植物約在 1967 年至 1970 年間引進本省栽培，由園藝考察團或張氏等人分別自菲律賓及馬來半島等地引入[(7)]，初期種植的品種有豔紅赫蕉 *Heliconia humilis* (Aubl.) Jacq.、金鳥赫蕉 *H. rostrata* Ruiz et Pav.和 *H. latispatha* Benth.。1979 年出版之台灣植物誌則只收錄豔紅赫蕉一項而已[(2)]，可能當時本省赫蕉之商業栽培尚不普遍並呈零星分佈。目前較具栽培規模之切花品種如俗名長尾鸚鵡花或彩虹鳥蕉的 *H. psittacorum* 'Rhizomatosa' (圖 1)、紅鳥蕉 *H. psittacorum* 'Rubra'以及名爲鸚鵡花或黃鸝鳥蕉的

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1958 號。
2. 臺灣省農業試驗所助理、助理研究員及研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 國立中興大學園藝學系副教授。臺灣省　臺中市。

雜交品種 *H. psittacorum* 'Golden Torch'，則約在 1988 年坊間出版之園藝圖書方見介紹[10]，據此推估，這三個新栽培種引入本省種植的時間，應僅十餘年，但因受經濟快速發展、國人生活水準大幅提升等因素影響，近年來此種花色多變及苞片豔麗、吸水性良好的切花材料，正逐漸受到關注與喜愛，更因其形狀酷似天堂鳥花，故又有"小天堂鳥"的稱號，現今以屏東地區栽培較多並少量外銷日本。

圖 1. 彩虹鳥蕉的花朵及其花序。(比例尺＝ 2 cm)

Fig.1. The inflorescence and flowers of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'. (Scale bar ＝ 2 cm)

在美國夏威夷地區收集選育之赫蕉栽培種總數約達 90 種[16]，其生長習性大部份呈叢生狀(clumping)，並利用地下根莖萌生之新芽進行營養繁殖，但此種分株繁殖方式對於生產赫蕉種苗而言是相當不利的，例如日本地區對於輸入的農業產品採取嚴格檢疫制度，依其植物保護法規定，進口植物不能帶有泥土，且凡是出口到日本的花卉必需具有由出口國家簽證的植物衛生檢驗證明文件，一旦發現有病原菌或虫害，必須由進口承銷商負責消毒、銷毀或退回[5]。夏威夷地區就曾在赫蕉類植株發現青枯病菌〔*Pseudomonas solanacearum* (Smith)〕，而被檢疫嚴格的國家拒絕進口[29]。爲求本省花卉產品及種苗能在國際市場佔有一席之地，利用組織培養技術大量繁殖健康種苗並藉由生物科技進行新花色或新品種之誘變選育，應是值得研究的目標。

目前本省從事赫蕉組織培養之研究尙不多見，相關文獻也以各品種在植物學、生態學或形態學方面的描述較多[12,14,17,19,20,21,23]，只有少數提到培植體之消毒與培養[15,25,29,30]，且造成本省赫蕉作物離體培

養高污染率之菌體種類也未見報導，因此本試驗以彩虹鳥蕉爲材料，進行植株各部位培植體之離體培養，嘗試篩檢污染菌類，並尋求降低高污染率的方法。

材料與方法

一、植株不同部位離體培養之污染率比較

(一)自田間切取株齡一年半左右之彩虹鳥蕉植株剛開展葉片、子房、花梗及地下根莖萌生之新芽爲供試培植體，材料取得後先去除泥土、雜質與腐壞的部份，並以自來水沖洗乾淨。

(二)培植體外部以 75 ％ 酒精棉擦拭或用酒精溶液浸漬殺菌 30 秒後，換以 0.5-1 ％ 次氯酸鈉溶液超音波振盪消毒 15-20 分鐘，在無菌操作台上用無菌水清洗三次，再將培植體接種於事先配製好的培養基上，其中葉片培植體橫切爲三，依序分爲葉柄、葉片下半部及葉片上半部。

(三)葉片、子房及花梗等培植體誘導癒合組織之培養基組成分爲含MS[28]基本鹽類，另外添加 2 mg/l 2,4-D 、2 mg/l kinetin 、3 ％ sucrose 和 0.3 ％ gelrite, pH ＝ 5.7。而根莖新芽誘導芽球體之培養基組成分除含 MS 基本鹽類外，另添加 2 mg/l BA 、1 mg/l NAA 、3 ％ sucrose 和 0.3 ％ gelrite, pH ＝ 5.7。

二、污染菌種檢定

(一)上述各培植體離體培養約三星期後，調查各部位培植體的污染情形，並將培植體切口處出現之菌種取出依下列步驟進行檢定。

(二)菌種純化

1. 在無菌操作台上以接種環挑取污染之菌種，輕劃於 NA 培養基 (Nutrient agar, Difco, 3 g/l Bacto beef extract, 5 g/l Bacto peptone, 15 g/l Bacto agar)，再置入 32℃恆溫箱中培養，經 24 小時後挑取單一菌落，重覆上述步驟三次後將菌種培養於含 NA 培養基之試管中備用。
2. 將純化之菌株回接於第一項所示之培養基，觀察是否與原來菌落型態相同，若無差異則進行下一步驟。

(三)簡易革蘭氏陽性/陰性菌之判斷

1. 在無菌操作台上以牙籤挑起菌種，並與事先配製好之 3 ％ KOH溶液 1-2 滴在載玻片上充份混合[32]。
2. 如混合液出現黏稠絲狀，此一菌種應屬革蘭氏陰性(GN)細菌，否則即爲革蘭氏陽性(GP)細菌。

(四) Biolog GN Microplate Identification System 鑑定污染菌種

1. 挑取供試菌種之單一菌落，培養於含 15 g/l Bacto tryptone、5 g/l Bacto soytone、5 g/l sodium chloride 及 15 g/l Bacto agar 之 TSA 培養基(Tryptic Soy Agar)約 16-20 小時。
2. 在無菌操作台上用接種環沾取菌落，置入裝有 17-20 ml 之無菌生理食鹽水(0.85 ％ NaCl)中。
3. 用振盪器混合均勻後，再以光譜儀(Bausch & Comb Spectrophotometer 70)測定其 OD_{590} 值(混濁度)爲 0.3。
4. 利用電子定量分注器將細菌懸浮液分注於具有 96 個孔穴之 Biolog Microplate GN 專用反應盤(含 95 種基質及對照孔穴)，每一孔穴約 0.15 ml。
5. 反應盤置於室溫下保濕，分別於反應 4 小時及 24 小時後以 Emax Precision Microplate Reader 設定 Wavelength O.D.＝ 490 nm 判讀，並將資料輸入資料庫中比對以確定其分類地位。

(五)農桿菌病原性測定

1. 胡蘿蔔接種測定

(1)新鮮胡蘿蔔肉質根先以自來水清洗乾淨，外部再用棉花沾取 75 ％ 酒精溶液擦拭消毒，並於無菌操作台上橫切成數塊，每塊厚約 1.2 ㎝。

⑵在無菌操作台上用接種環沾取待測之農桿菌菌落，接種於胡蘿蔔肉質根形成層上，另以無菌水及已知具有病原性之榕樹農桿菌株(菌株編號 85007)[8]為對照組，分別接種於胡蘿蔔肉質根形成層上，各組均置於室溫下以培養皿保濕培養，並觀察有否腫瘤產生。

2.番茄接種測定

⑴以培植於網室內之農友 301 番茄幼苗為供試植株，取培養於PDA培養基 2 天之菌泥為接種源，用蟲針刺傷及剪刀剪傷等方法在莖部製造傷口，再將接種源塗抹於傷口處。

⑵供試植株接種後放置 28℃環境下，以塑膠袋套袋保濕 24 小時，並各以無菌水及已知具有病原性之榕樹農桿菌株(菌株編號 85007)[8]接種作為對照組，觀察並記錄病徵出現情形。

三、不同生育環境對降低培植體污染率之影響

㈠將與第一項所示相同株齡之植株掘起相當數量並均分為二，第一組在除去枯葉雜質後，立即移植於不遮光的溫室土壤栽培床(300cm×180cm)；第二組則以自來水沖洗乾淨並浸漬於含億力殺菌劑 1000 倍水溶液中 2 小時後，再栽種於溫室另一個無土介質栽培床(300cm×180cm)，所用介質為樹皮碎塊：發泡煉石＝ 1：1。

㈡在不同生育環境栽培 3-4 個月後，分別採取如第一項所示之各部位培植體，經外部消毒殺菌後接種於如第一項所示之培養基中，每個試驗重覆 3 次。

㈢各培植體離體培養約三星期後，調查各部位培植體的污染情形。

四、抗生素浸漬預處理對降低子房污染率之影響

㈠自田間採取花瓣剛脫落 1-3 日左右之彩虹鳥蕉子房，經外部消毒殺菌後，先浸漬於含不同抗生素比例之浸漬液中，經 24 小時與 48 小時振盪培養後分別取出，再接種於固體培養基中，固體培養基組成分與第一項所示者相同；浸漬液則須去除 gelrite，再分別添加 50 mg/l 鏈黴素(streptomycin sulfate, Sigma)、50 mg/l 見大黴素(gentamycin sulfate, Sigma)及 100 mg/l 鏈黴素、50 mg/l 見大黴素。

㈡子房培植體培養約三星期後調查其污染情形，經 45 天後觀察不同抗生素濃度對子房誘導產生癒合組織之影響。

以上試驗有關污染率之調查結果，係採用二項分佈(Binomial distribution)95％ 信賴區間(confidence limits)檢定處理間之差異；計算污染率平均值則以 least significant difference (LSD5％) test 檢定處理間之差異。上述各項試驗中新芽培植體置於溫度 24℃、光照 12 hr、光量為 $100\mu E/m^2 \cdot s$ 及光波長為 350-800 nm 環境下誘導產生芽球體；葉片、花梗與子房則置於溫度 24℃暗櫃中培養以誘導產生癒合組織。

結　果

一、植株不同部位離體培養之污染率比較

表 1 結果顯示，經離體培養 21 天後之彩虹鳥蕉各部位培植體，以根莖萌生的新芽在接種 30 個樣本中細菌污染率達 100％ 最高；葉片上半部的污染率 56.7％ 較低，其餘如葉片下半部(83.3％)、葉柄(80％)、子房(90％)和花梗(96.7％)之污染率皆在八成以上，經二項分佈 95％ 信賴區間檢定彼此差異後發現，葉片上半部的污染率與花梗、根莖新芽差異較明顯。

表 1. 彩虹鳥蕉不同部位培植體離體培養之污染率[z]

Table 1. Contamination rate of different explants from donor plants for establishing *in vitro* culture of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'.[z]

Explants	No. of explants cultured	Contamination after 21 days of culture	
		%	95 % CL[y]
Leaf tip	30	56.7	37- 75
Leaf base	30	83.3	65- 94
Petiole	30	80.0	61- 92
Oveary	30	90.0	73- 98
Peduncle	30	96.7	83-100
Bud	30	100.0	88-100

[z] Leaf、ovary and peduncle cultured medium：MS basic salts with 2mg/l 2, 4-D、2mg/l kinetin、3 % sucrose and 0.3 % gelrite, pH = 5.7.

Bud culture medium：MS basal salts with 2mg/l BA、1mg/l NAA、3 % sucrose and 0.3 % gelrite, pH = 5.7.

[y] 95 % confidence limits of Binomial distribution.

二、污染菌種檢定

挑取培養於 TSA 培養基已達 16-20 小時之各供試菌種單菌落進行檢定，經 Biolog GN Microplate 測定判讀結果如表 2 所示，有六種細菌分別對反應盤所提供的 95 種不同基質之利用情形與資料庫比對後確定了分類地位，再經查閱細菌學名詞辭典[4]相關菌種屬名後，計檢出農桿菌屬細菌一種(*Agrobacterium tumefaciens*)、假單胞菌屬細菌二種(*Pseudomonas diminuta, P. putida*)、賽氏桿菌屬細菌一種(*Serratia marcescens*)、單胞菌屬細菌一種(*Xanthomonas campestris*)以及 *Sphingomonas pancimobilis*，其全爲革蘭氏陰性，且經比對後之 GN Biolog 相似度皆達七成以上，其菌落在含 MS 基本鹽類培養基上的滋生情形分別如圖 3-8 所示，其中 *A. tumefaciens* 的相似度高達 88.6％ ，且在 NA 培養基上的單菌落呈白色黏濕且明亮有光澤。另取此種農桿菌屬菌落以及無菌水作爲接種源，經接種觀察皆未在胡蘿蔔肉質根形成層及番茄幼苗莖部出現腫瘤病徵，但接種具有病原性農桿菌之對照組則已產生腫瘤。

表 2. 分離自彩虹鳥蕉培植體之細菌名稱

Table 2. Bacteria isolated from different explants of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'.

Species of bacterium	Gram's strain	GN Biolog similarity (%)
Agrobacterium tumefaciens	negative	88.6
Pseudomonas putida	negative	82.1
Pseudomonas putida	negative	89.7
Serratia marcescens	negative	75.6
Sphingomonas pancimobilis	negative	71.4
Xanthomonas campestris	negative	78.6

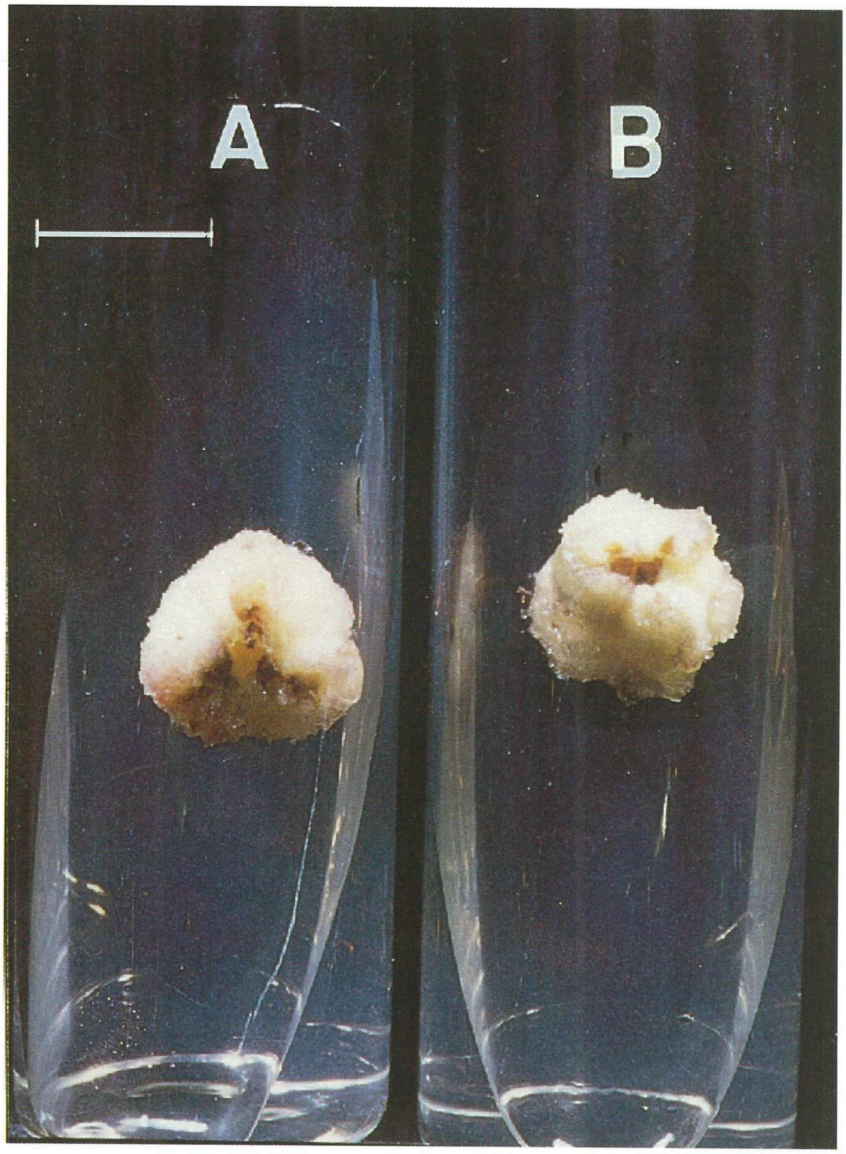

圖 2. 100mg/l streptomycin 及 50mg/l genetamicin 預處理彩虹鳥蕉子房，在離體培養 45 天後癒合組織之誘導情形。(比例尺＝ 1 cm)
A： 處理 0 小時(對照組)；B：處理 24 小時。

Fig. 2. Appearance of induced callus in ovary explants pretreated with 100mg/l streptomycin and 50mg/l genetamycin after 45 days cultured *in vitro*. (Scale bar ＝ 1cm) A：0 hr (CK)； B：24 hrs.

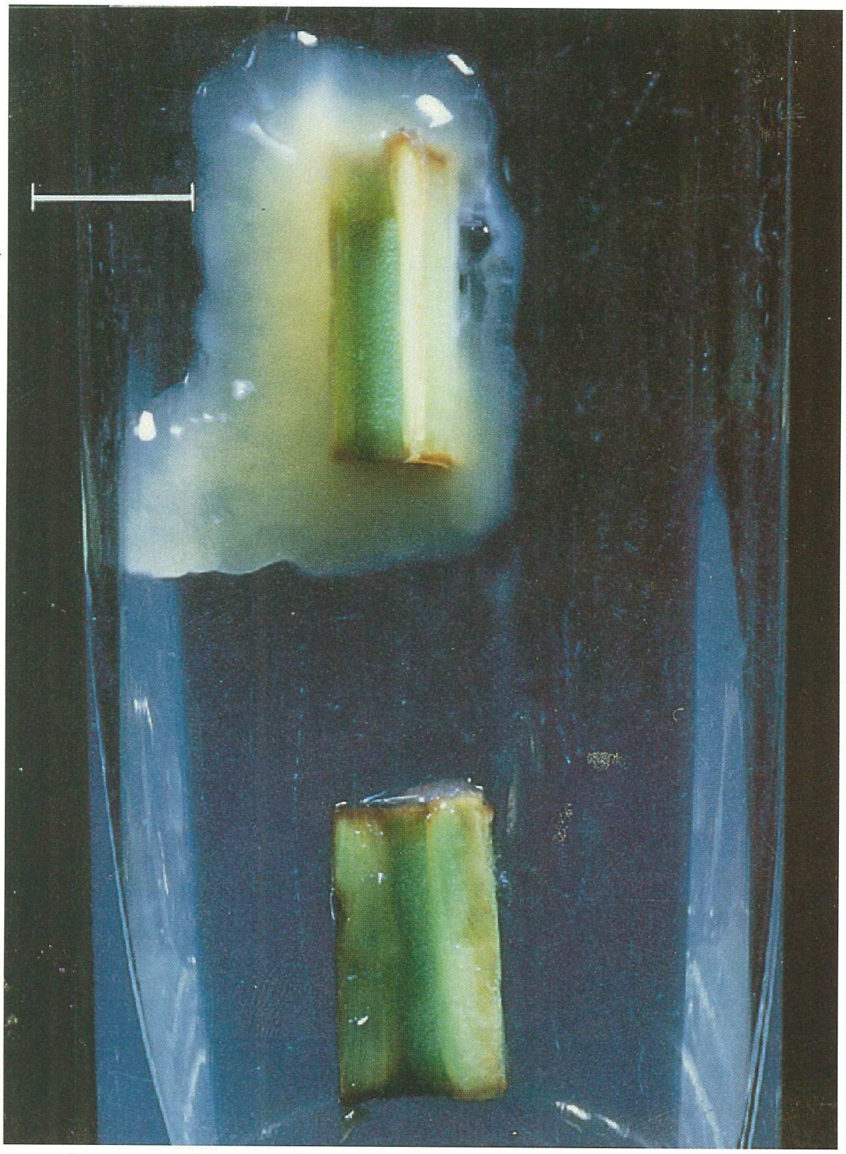

圖 3. *Sphingomonas pancimobilis* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5 cm)

Fig. 3. Appearance of contaminated explants by *Sphingomonas pancimobilis* on MS medium. (Scale bar = 0.5cm)

圖 4. *Xanthomonas campestris* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5 cm)

Fig. 4. Appearance of contaminated explants by *Xanthomonas campestris* on MS medium. (Scale bar ＝ 0.5cm)

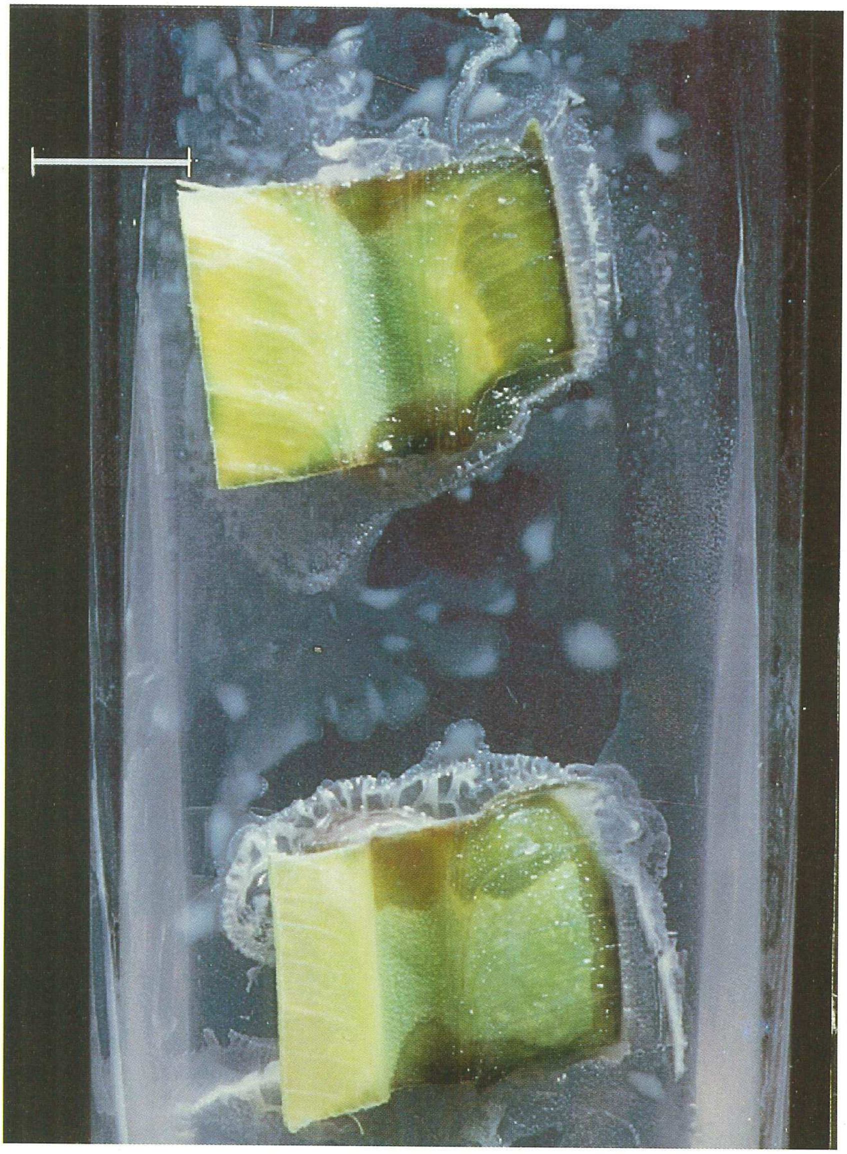

圖 5. *Pseudomonas putida* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5cm)

Fig. 5. Appearance of contaminated explants by *Pseudomonas putida* on MS medium. (Scale bar ＝ 0.5cm)

圖 6. *Agrobacterium tumefaciens* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5cm)

Fig. 6. Appearance of contaminated explants by *Agrobacterium tumefaciens* on MS medium. (Scale bar = 0.5cm)

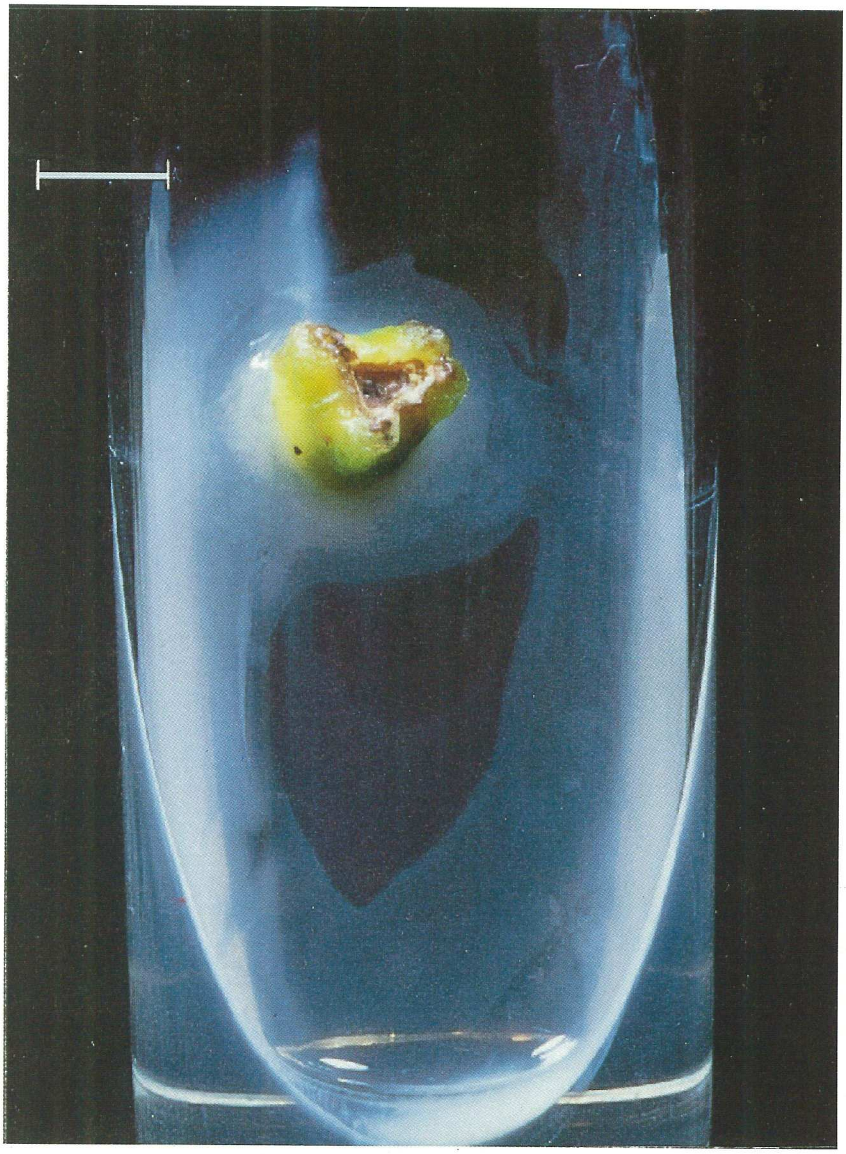

圖 7. *Pseudomonas diminuta* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5cm)

Fig. 7. Appearance of contaminated explants by *Pseudomonas diminuta* on MS medium. (Scale bar = 0.5cm)

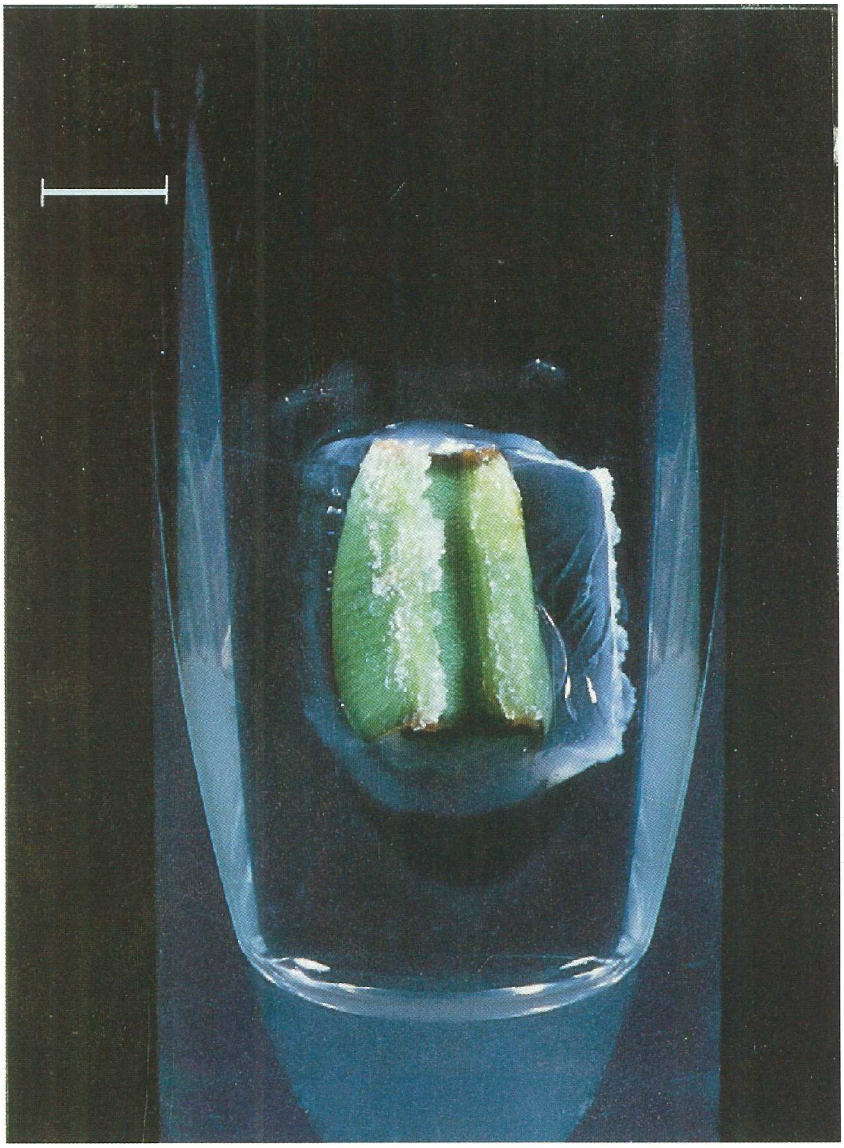

圖 8. *Serratia marcescens* 細菌在培植體上之污染情形。(比例尺＝ 0.5cm)

Fig. 8. Appearance of contaminated explants by *Serratia marcescens* on MS medium. (Scale bar = 0.5cm)

三、不同生育環境對降低培植體污染率之影響

表 3 結果顯示，取自溫室無土介質栽培區之彩虹鳥蕉葉片培植體，在每 20 個樣本中平均有 46.5 % 受到污染，而取自田間及溫室土壤栽培區者，則平均污染率分別達到 85.0 % 及 78.5 % ，差異顯著；花梗培植體之污染情形經比較後也得到相似的結果；比較不同生育環境下的子房培植體平均污染數則發現，不論是生長於溫室土壤栽培區或無土介質栽培區者，在每 20 個樣本中平均僅有 30.0 % 與 21.5 % 受到污染，皆顯著低於取自田間之 93.5 % 。至於以根莖新芽作爲供試材料者，則在每 10 個樣本中，生長在溫室無土介質栽培區的平均污染率 63.0 % ，也顯著低於取自另外二種生育環境之平均污染率 (97.0 % 及 93 %)。

表 3. 不同生育環境對彩虹鳥蕉培植體離體培養污染之影響[z]

Table 3. The influence of growing condition on contamination of *in vitro* culture of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'.[z]

Environment[y]	% leaf explant contaminated[x]	% peduncle explant contaminated[x]	% ovary explant contaminated[x]	% bud explant contaminated[x]
Field (CK)	85.0a	91.5a	93.5a	97.0a
Greenhouse A	78.5a	80.0a	30.0b	93.0a
Greenhouse B	46.5b	48.5b	21.5b	63.0b

[z] Same as Table 1.

Sample size：20 for leaf, peduncle and ovary explants; 10 for bud explants.

[y] A：plants cultured in soil compost, B：plants cultured in calcined clay：blay：barks (1：1)mix.

[x] Means followed by the same letter in the same collumn are not significantly different at 5 % level by least significant dif ference (LSD) test.

四、抗生素浸漬預處理對降低子房污染率之影響

表 4 結果顯示，以取自田間之彩虹鳥蕉子房爲供試材料，經浸漬於含 MS 基本鹽類、2 mg/l 2,4-D 、2 mg/l kinetin 、3 % sucrose 及添加 100 mg/l streptomycin sulfate、 50 mg/l gentamycin sulfate 之液體培養基中，經振盪培養 24 小時與 48 小時後，再移種於誘導產生癒合組織之固體培養基培養 21 天後，每 50 個樣本數分別有 20 及 23 個受細菌污染，污染率爲 40 % 與 46 % ，略低於浸漬於添加 50 mg/l streptomycin sulfate、50 mg/l gentamycin sulfate 液體培養基者(72 % 與 68 %)，並且明顯低於對照組的 86 % 污染率及浸漬於不含抗生素液體培養基中 24 小時、48 小時之 80 % 與 90 % 。培養於固體培養基 45 天後，調查各處理組無污染現象之子房培植體誘生癒合組織數，結果各處理組之誘生率皆達七成以上，若以浸漬於無添加抗生素與添加 100 mg/l streptomycin sulfate、50 mg/l gentamycin sulfate 液體培養基 24 小時者相互比較，發現其誘生癒合組織率分別爲 80.0 % 及 73.3 % ，兩者再以二項分佈(Binomial distribution) 95 % 信賴區間(confidence limits)檢定後得知處理間差異不明顯(圖 2)。

表 4. 抗生素預處理對彩虹鳥蕉子房培植體離體培養污染之影響[z]

Table 4. Effect of antibiotic pretreatment on ovary explant contamination of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'.[z]

Pretreatment with antibiotic liquid medium			Contamination after 21 days of culture		Uncontaminated ofter 45 days of culture		
						callus induced	
S[y] (mg/l)	G[y] (mg/l)	Time (hr)	%	95 % CL[x]	No.	%	95 % CL[x]
0	0	0	86	73-94	7	85.7	51-100
0	0	24	80	66-94	10	80.0	44- 97
0	0	48	90	78-97	5	100.0	60-100
50	50	24	72	57-84	14	71.4	43- 92
50	50	48	68	54-80	16	81.3	53- 96
100	50	24	40	27-55	30	73.3	54- 88
100	50	48	46	32-61	27	85.2	67- 96

[z] Solid medium：MS basal salts with 2mg/l 2, 4-D、2mg/l kinetin、3 % sucrose and 0.3 % gelrite, pH = 5.7.

Sample size：50 explants per treatment.

[y] "S"= Streptmycin; "G"= Genetamycin.

Explants were pretreated in a antibiotic contain liquid medium. The liquid medium was same as soild medium described above except without 0.3 % gelrite.

[x] 95 % Confidence limits of Binomial distribution.

討　論

彩虹鳥蕉爲多年生草本植物，其地上部莖節實際上是由直立且內部充滿空氣及圓筒狀導管的葉鞘所重疊構成的"假莖"(pseudostem)，地下部根莖則位於假莖基部處，根莖萌生之新芽是促使分枝的開始，因其生長勢相當強健，所以能在短期內形成數量龐大的單一無性繁殖體系(monoclonal populations)[16]。試驗顯示，此種植株各部位培植體在建立離體培養時，遭受細菌污染的比例甚高，由於在進行組織培養前，外部必先經過 75 % 酒精及 0.5 % -1 % 次氯酸鈉溶液之殺菌處理，結果仍無法有效抑制培植體污染，依此推斷污染菌源應是潛藏於組織內部，故在經過消毒程序後仍能存活，尤其是子房之離體培養，不但細菌污染嚴重，且發霉率也比其他培植體高；此可能與赫蕉類花朵基部具有似球莖狀之蜜室構造或子房被船形苞片包覆，遇到下雨或風砂吹襲時容易積水及藏污納垢有關。印證表 3 的試驗結果，從溫室區栽培的植株上取得的子房培植體，不論是種在土壤介質或無土介質者，其受細菌污染及發霉的比例顯著降低，可見藉由人工設施加強管理及淨化栽培，對降低組織培養污染具有正面的助益。

在植物組織培養上常藉由慎選培植體、改進消毒與操作技術或其他物理及化學的處理方法，達到令人滿意的抑菌效果。Pedersen 和 Brandt 曾選取百合水仙(*Alstroemeria*)和赫蕉屬的 *Heliconia psittacorum* 'Choconiana Dwarf'小於 4 cm的根莖新芽莖頂部位作爲培植體，經自來水沖洗乾淨後，依次使用 1 % NaOCl 消毒 10 分鐘、1 % NaOCl 消毒 5 分鐘及 0.5 % NaOCl 消毒 1 分鐘等三階段的切取及消毒法，結果獲得 81.5 % 無污染的培植體[30]。Nathan 等人則將田間挖取的 *Heliconia psittacorum* 根莖在經自來水沖洗後，放入聚乙烯袋(polyethylene bags)中並在 25℃室溫下保存 5、7 天以取得長度約僅 1 cm 左右的芽體，經 80 % 酒精溶液浸漬 30 秒及使用 0.8 % NaOCl 消毒 15 分鐘、0.4 % NaOCl 消毒 10 分鐘等二階段消毒後，分別在 34 及 42 個供試芽體中，得到 19 與 28 個無污染的培植體，顯著高於其他處理組[29]。

較常被使用的物理性方法除上述淨化栽培法外，也有利用適當加溫設備的熱水處理法，對於採收前後附著於植物體之病原菌，具有一定的防治效果，如Doornik將罌粟草玉梅*(Anemone coronaria)*球莖使用 47.5℃熱水處理 1 小時，結果成功地殺死 99％ 以上的次盤孢屬眞菌*(Colletotrichum acutatum)*孢子[18]。Burr 等人也曾報導，利用四種不同的熱處理方法 (50℃處理 30 及 60 分鐘、30℃處理 2 小時再改用 50℃處理 90 分鐘、 55℃處理 30 分鐘)，可以顯著降低葡萄插穗受到 *Agrobacterium vitis* 病原菌之危害[13]。彩虹鳥蕉之根莖新芽及子房等培植體，應用熱水處理以降低污染菌類是值得探討的問題，作者將繼續進行這方面的研究。

利用化學法去除培植體內各種菌類污染源，多在培養基內添加各類抗生素或殺菌劑。Arditti 等人報導蝴蝶蘭 *(Phalaenopsis)*利用花梗節進行營養繁殖時，於培養基中適量添加50mg/l億力殺菌劑、25mg/l nystatin、100mg/l 盤尼西林(penicillin)、 50mg/l gentamycin sulfate 或 2g/l graphite，能有效降低培植體污染[11]。Thomas轉述研究資料認爲，在茶樹及山茶花莖頂組織培養過程中，培植體先以 1-4g/l benomyl 和 10-50 mg/l rifampicin 處理 24 小時，可有效降低微生物污染並且無毒害作用[33]。Reed 等人也以 Timentin (500 mg/l 或 1,000 mg/l)配合 streptomycin (1,000 mg/l)預處理榛子*(Corylus avellana* L.)三個不同品種的莖頂培植體 10 天，結果僅有 10-50％ 受到細菌污染[31]。而某些種類的抗生素如 cefotaxime (60-100 mg/l)之添加使用，不但有不錯的抑菌效果，且能適度刺激培植體的分化與再生[26,27]；此外，Klocke and Myers 曾在培養油栗*(Simmondsia chinensis)*的培養基中添加 10-100 mg/l Acephate (Orthene)藥劑，以防治莖節培植體之污染源，其選用此種藥劑的原因，是著眼於其防治效果優異，水溶性良好便於調配且對於哺乳類動物及植物而言相對毒性較低[24]；由上述實例得知，培養基添加化學藥劑或抗生素類，如能考慮到植物的耐受性、藥劑的種類、特性與用量、適用的微生物菌種以及毒性殘留等問題，方能得到良好的抑菌效果。本研究表 4 的結果也顯示，在彩虹鳥蕉子房培植體接種到固體培養基以誘導產生癒合組織前，先用已添加 100 mg/l streptomycin sulfate 及 50 mg/l gentamycin sulfate 的浸漬液，振盪培養 24 及 48 小時，能有效降低細菌性污染率，且處理後對子房癒合組織之誘導無不良影響。

Reed等人曾檢定造成榛子莖頂培植體污染的細菌種類，結果分離出包括*Agrobacterium radiobacter* B, *Enterobacter asburiae, Pseudomonas fluorescens* 以及 *Alcaligenes* 屬、*Flavobacterium* 屬和 *Xanthomonas* 屬之細菌[31]。本試驗之表 2 也列出了造成彩虹鳥蕉各種培植體污染的可能細菌種類，其中又以檢出農桿菌屬的 *Agrobacterium tumefaciens* 最爲重要，其爲好氣性細菌。據研究本屬細菌的某一種類會引起植物癌腫病，且菌株的寄主包括有桃、梨、杏、葡萄、蘋果等經濟類果樹及菊花、玫瑰等觀賞花卉[8]。本省有關癌腫病最早記載爲 1959 年在做甜菜病害調查時發現[3]，另在 1967 及 1980 年也分別從蘋果和檸檬桉記錄到癌腫病[6,9]，但對於病原菌的檢定遲至 1992 年才在台灣赤桉及玫瑰桉植株腫瘤上分離出 *A. tumefaciens*[1]；許等人更在本省金門榕*(Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao cv. Kin-men)、中葉榕*(Ficus microcarpa* L. f. cv. Middle-leaf)及生長在屏東地區的小葉榕*(Ficus microcarpa* L. f. var. *pusilifolia* Liao)植株腫瘤上，分離出相似的病原菌種[8]。本試驗自彩虹鳥蕉所分離到的 *Agrobacterium* 屬菌種經 Biolog 反應盤重覆檢驗確定，但將菌株接種到胡蘿蔔肉質根及番茄植株莖部培養觀察一個月後並無腫瘤發生，據此研判分離自彩虹鳥蕉之農桿菌屬細菌應不具病原性，若參照 1984 年 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 一書對此屬菌種的區分方式，將無病原性者稱爲 *A. radiobacter*，而會引起腫瘤病者才稱爲 *A. tumefaciens*，則本試驗檢出之農桿菌屬細菌雖然在生化反應上與 *A. tumefaciens* 有 88.6％ 的相似度，但似應稱作 *A. radiobacter* 爲宜[22]。

Agrobacterium 屬細菌存在於彩虹鳥蕉植株體內，在本省爲首度發現，雖然初步證實其並非病原菌，但在組織培養時仍應設法降低培植體之各種感染源，本研究利用淨化栽培及添加適量抗生素的液體培養基浸漬預處理，對降低培植體污染具有明顯效果，故對本省未來發展熱帶花卉產業、建立自主性赫蕉健康種苗繁殖技術及拓展外銷市場的努力應有良好的助益。

引用文獻

1. 王維洋。1992。台灣桉樹病害調查報告。林業試驗所研究報告季刊 7：179-194。
2. 台灣植物誌編輯委員會。1979。FLORA OF TAIWAN。現代關係出版社。Volume 6：174 頁。台北市。
3. 朱學曾、胡舉和。1959。甜菜病害之調查研究－台灣甜菜病害。台灣糖業試驗所研究彙報 19：21-34。
4. 吳佳倩、吳連生。1984。細菌學名詞辭典。名山出版社。118 頁。台北市。
5. 李皇照。1996。日本熱帶花卉市場需求遠景。台灣花卉園藝 105： 54-58。
6. 孫守恭。1967。台灣溫帶果樹之病害。植物保護學會會刊 9：96-97。
7. 陳德順、胡大維。1976。台灣外來觀賞植物名錄。川流出版社。369-370 頁。台北市。
8. 許秀惠、林俊義、陳福旗。1997。榕樹細菌性癌腫病菌(*Agrobacterium tumefaciens*)在台灣之發生。植物保護學會會刊 39：195-205。
9. 謝煥如。1980。台灣木本植物病害調查報告(三)。中華林學季刊 13：129-139。
10. 薛聰賢。1988。家庭園藝(臺灣的觀賞花木)。農學社。第 1 輯：49 頁；第 7 輯：26-27 頁；第 10 輯：25 頁。台北市。
11. Arditti, J., A. Johnson, and R. G. Perera. 1981. Culture media which do not require sterilization：*Phalaenopsis* flower stalk nodes. Orchid Rev. 89：49-52.
12. Broschat, T. K., and S. E. Svenson. 1994. DCPTA enhances growth and flowering of Heliconias. HortScience 29：891-892.
13. Burr, T. J., C. L. Reid, D. F. Splittstoesser, and M. Yoshimura. 1996. Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis in vitro* and in dormant grape cuttings. Am. J. Enol. Vitic. 47：119-123.
14. Catley, J. L., and I. R. Brooking. 1996. Temperature and light influence growth and flower production in *Heliconia* 'Golden Torch'. HortScience 31：213-217.
15. Criley, R. A. 1988. Propagation of tropical cut flowers：*Strelitzia, Alpinia and Heliconia.* Acta Hort. 226：509-517.
16. Criley, R. A., and T. K. Broschat. 1992 . *Heliconia*：botany and horticulture of a new floral crop. Hort. Rev. 14：1-55 .
17. Criley, R. A., and S. Lekawatana. 1995. Year round production with high yields may be a possibility for *Heliconia chartacea.* Acta Hort. 397：95-101.
18. Doornik, W. A. 1990. Hot-water treatment to control *Colletotrichum acutatum* on corms of *Anemone coronaria.* Acta Hort. 266：491-494.
19. Geertsen, V. 1990. Influence of photoperiod and temperature on the growth and flowering of *Heliconia aurantiaca.* HortScience 25：646-648.
20. Hansen, J. D., H. T. Chan, Jr., A. H. Hara, and V. L. Tenbrink. 1991. Phytotoxic reaction of Hawaiian cut flowers and foliage to hydrogen cyanide fumigation. HortScience 26：53-56.
21. He, J., C. W. Chee, and C. J. Goh. 1996. "Photoinhibition" of *Heliconia* under natural tropical conditions：the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. Plant Cell Environ. 19：1238-1248.
22. Kersters, K., and De Ley. J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. pp. 244-254. In：N. R. Kneg and J. G. Holt (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
23. Kirchoff, B. K. 1992. Ovary structure and anatomy in the Heliconiaceae and Musaceae (Zingiberales). Can. J. Bot. 70：2490-2508.
24. Klocke, J. A., and P. Myers. 1984. Chemical control of thrips on cultured *Simmondsia chinensis* (Jojoba) shoots. HortScience 19：400.
25. Kumar, P. P., M. J. Nathan, and C. J. Goh. 1996. Involvement of ethylene on growth and plant regeneration in callus cultures of *Heliconia psittacorum* L. f. Plant Growth Reg. 19：145-151.
26. Mathias, R. J. 1987. Cefotaxime：potential regeneration induction switch. Agricell Rep. 8：11.
27. Mathias, R. J. 1988. Antibiotic stimulates growth and differentiation of barley tissue cultures. Agricell Rep. 10：19.

28. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15：473-497.

29. Nathan, M.J., C. J. Goh, and P. P. Kumar. 1992. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. HortScience 27：450-452.

30. Pedersen, C., and K. Brandt. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*. Acta Hort. 325：499-504.

31. Reed, Barbara M., J. Mentzer, P. Tanprasert, and X. Yu. 1998. Internal bacterial contamination of micropropogated hazelnut：identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52：67-70.

32. Suslow, T. V., M. N. Schroth, and M. Isaka. 1982. Application of a rapid method for gram-differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72：917-918.

33. Thomas, R. L. 1987. Control of woody plant culture contaminants. Agricell Rep. 9：38.

Studies on Tissue Culture of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'

I. Identification and Control of Bacterial Contamination of Explants Cultured *In Vitro*[1]

Yih-Juh Shiau[2], Shiow-Huey Hseu[2], Tsai-Yih Wang[3] and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

This study were to identify and control the contaminants in tissue culture of *Heliconia psittacorum* 'Rhizomatosa'. Explants from different parts of *H. psittacorum* 'Rhizomatosa' were tested for the percentage of contamination. The lowest contamination rate was obtained from leaf tip explants (57.7 %) after 21 days of culture, and 80 % ,83.3 % ,90 % ,96.7 % ,100 % contamination for petiole, leaf base, ovary, peduncle and terminal bud, respectively. Six species of bacteria were isolated and characterized from explants of *H. psittacorum* 'Rhizomatosa'. All of them were Gram negative, and were identified as *Agrobacterium radiobacter, Pseudomonas diminuta, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Sphingomonas pancimobilis and Xanthomonas campestris.* Influence of explant derived from greenhouse-grown and field-grown plants on contamination was studied. A lower explant contamination rate was obtained from plants grew in the soilless medium in the greenhouse. Preculturing ovary explants in a liquid medium containing antibiotics to control of contamination was investigated. Lower contamination rates (40 % and 46 %) were obtained from explants pre-cultured in the liquid MS medium containing 100 mg/l streptomycin sulfate (Sigma) and 50 mg/l gentamycin sulfate (Sigma) for 24 or 48 hrs, while higher contamination rates (72 % and 68 %) were obtained when lower concentration of streptomycin sulfate was used (50 mg/l). A highest contamination rate was observed from the control treatment which was without any preculture of antibiotic medium. No significant difference between antibiotic and control treatments was found on callus induction rate after 45-day cultures.

Key words : *Heliconia psittacorum, In vitro,* Explant, Bacterial identification.

---

1. Contribution No. 1958 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Research Assistant, Research Assistant and Senior Agronomist, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate professor, Department of Horticulture, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.